动 物 学 研 究 2013，Feb. 34(1): 39−46 CN 53-1040/Q ISSN 0254-5853
Zoological Research DOI：10.3724/SP.J.1141.2013.01039

脊尾白虾组织蛋白酶 L 基因的克隆及其表达分析

段亚飞[1,2]，刘 萍[1,*]，李吉涛[1]，李 健[1]，高保全[1]，陈 萍[1]

1. 中国水产科学研究院黄海水产研究所 青岛 266071；
2. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306

摘要：根据本实验室构建的脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)血细胞全长 cDNA 文库获得的 EST 序列，利用 RACE 技术克隆获得脊尾白虾组织蛋白酶 L 基因的 cDNA 全长，命名为 *EcCatL* 基因。该序列全长 1136 bp，包括 5'非编码区 24 bp，开放阅读框 960 bp 和 3'非编码区 152 bp，开放阅读框共编码 319 个氨基酸，预测相对分子量为 35.30×10^3，理论等电点为 5.27。同源性分析表明，脊尾白虾组织蛋白酶 L *EcCatL* 氨基酸序列与其它甲壳动物高度保守，与变色小长臂虾(*Palaemonetes varians*)及北极甜虾(*Pandalus borealis*) CatL 的同源性分别为 92%和 76%。系统进化分析表明，EcCatL 基因氨基酸序列与变色小长臂虾的 CatL 聚为一支。荧光定量 PCR 分析结果表明，*EcCatL* 基因在血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢、肠、胃及眼柄中均有表达，其中肝胰腺中的相对表达量最高。感染鳗弧菌及 WSSV 后 6 h 和 12 h，脊尾白虾血细胞和肝胰腺中 *EcCatL* 的表达量较对照组均极显著增加($P<0.01$)，且具有明显的时间差异性，表明 *EcCatL* 基因在脊尾白虾免疫反应中具有重要作用。

关键词：脊尾白虾；组织蛋白酶 L；基因克隆；基因表达
中图分类号：Q959.223+.63; Q785; Q786 **文献标志码**：A **文章编号**：0254-5853-(2013)01-0039-08

Cloning and expression analysis of Cathepsin L cDNA of *Exopalaemon carinicauda*

Ya-Fei DUAN[1,2], Ping LIU[1,*], Ji-Tao LI[1], Jian LI[1], Bao-Quan GAO[1], Ping CHEN[1]

1. *Yellow Sea Fisheries Research Institute*, *Chinese Academy of Fishery Sciences*, *Qingdao* 266071, *China*;
2. *College of Fisheries and Life Science*, *Shanghai Ocean University*, *Shanghai* 201306, *China*

Abstract: Based on the EST sequence from a hemocyte cDNA library, the cathepsin L cDNA of *Exopalaemon carinicauda* (*EcCatL*) was cloned by rapid amplification of cDNA ends (RACE). The *EcCatL* cDNA was 1136 bp in length, which contains an open reading frame (ORF) of 960 bp, encoding a 319 amino-acid polypeptide. Homology analysis revealed that the amino acid sequence of *EcCatL* was highly conserved with its homologs in other crustaceans. The similarities of EcCatL with the CatL of *Palaemonetes varians* and *Pandalus borealis* were 92% and 76%, respectively. Phylogenetic analysis showed that *EcCatL* was in the same branch as that of *Palaemonetes varians*. The expression levels of *EcCatL* in different tissues were analyzed by quantitative real-time PCR. Expression of *EcCatL* was detected in all tested tissues of *E. carinicauda*, including hemocytes, gill, hepatopancreas, muscle, ovary, intestine, stomach and eyestalk, with the highest expression level in hepatopancreas. After challenged with *Vibrio anguillarum* or white spot syndrome virus, the expression of *EcCatL* were up-regulated in the hemocytes and hepatopancreas of *E. carinicauda*. Our results implied that *EcCatL* might play an important role in the prawn immune response.

Keywords: *Exopalaemon carinicauda*; Cathepsin L; Gene cloning; Gene expression

脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*)，是中国黄、渤海重要的底栖虾类 (Liu，1955)。因其繁殖能力强、生长速度快及环境适应性强等特点，养殖面积得到迅速扩大，成为我国近海重要的经济虾

收稿日期：2012-10-31；接受日期：2012-12-20
基金项目：国家高技术研究发展计划课题 (2012AA10A409)；国家虾产业技术体系 (CARS-47)；公益性行业(农业)科研专项 (201103034)；中国水产科学研究院基本科研业务费资助 (2013A0701)
*通信作者 (Corresponding author)，E-mail: liuping@ysfri.ac.cn
第一作者简介：段亚飞(1989-)，男，硕士研究生，主要从事海水养殖生物种质资源与遗传育种研究. E-mail: dxfei87@126.com

类。近年来，随着养殖规模的扩大及生态环境的不断恶化，虾类疾病频繁发生，造成了严重的经济损失(Li et al，2012a；Xu et al，2010)。脊尾白虾具有先天免疫防御功能，且其防御功能的发挥与免疫基因有关，因此发掘脊尾白虾免疫基因并加强免疫机制研究显得尤为重要。

组织蛋白酶 L(cathepsin L，*CatL*)是半胱氨酸蛋白酶中木瓜蛋白酶 C1 家族的主要成员，广泛存在于各种生物有机体中(Liu et al，2006；Zeng et al，2005)。它不仅参与生物体内的各种蛋白水解，还参与抗原呈递、组织再生、肿瘤入侵和转移、骨质吸收及细胞凋亡等重要生命活动(Dohchin et al，2000；Furuyama & Fujisawa，2000；Kos et al，2000；Lindeman et al，2004)。目前已见水产动物的组织蛋白酶 L 基因相关报道。组织蛋白酶 L 在凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)(Zhao et al，2007)、中国对虾(*Fenneropenaeus chinensis*)(Bu et al，2008)、中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)(Li et al，2010)及紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)(Venier et al，2006)等水产动物免疫系统中均发挥重要作用，但其在脊尾白虾中的研究尚未见报道。为深入了解组织蛋白酶 L 在脊尾白虾中的免疫作用，本研究利用从本实验室构建的脊尾白虾血细胞全长 cDNA 文库中筛选得到的组织蛋白酶 L 基因 EST 序列，采用 RACE 技术，克隆得到该基因全长 cDNA 序列，并对其在鳗弧菌(*Vibrio anguillarum*)和白斑综合症病毒(white spot syndrome virus, WSSV)感染后的脊尾白虾组织中的表达特征进行了初步研究，以期为脊尾白虾组织蛋白酶 L 生物学功能研究及其对病原的抗病机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

健康脊尾白虾取自青岛胶州，体长(5.81±0.32) cm，体重(1.18±0.35) g。暂养于 200 L 的 PVC 桶中，每桶 30 尾，暂养一周。养殖水温 24 ℃，盐度 25，pH 8.2，持续充氧，每天换水 1/3，投喂配合饲料。

TRIzol Reagent 购自 Invitrogen 公司；SMART^{TM} RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 购自 Clontech 公司；DNA 胶回收试剂盒购自上海生工公司；PMD18-T 载体和大肠杆菌 Top 10 感受态细胞均购自 TaKaRa 公司；其他试剂均为国产分析纯。

1.2 总 RNA 提取及 cDNA 的合成

Trizol 试剂提取血细胞总 RNA，按照 Invitrogen 说明书进行；紫外分光光度计与 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的质量及完整性。

1.3 全长 cDNA 的克隆及测序

根据本实验室已构建的脊尾白虾血细胞全长 cDNA 文库，通过随机测序获得组织蛋白酶 L 基因的 EST 序列，利用 Primer Premier 5.0 软件设计 3'RACE 和 5'RACE 特异性引物，所有引物均由上海生工合成。

3'和 5'末端扩增使用 SMART^{TM} RACE Amplification Kit 和 Advantage 2 PCR Kit 进行。3'RACE 使用引物 CatL-F1 (表 1)和通用引物 UPM 配对，进行 3'端扩增；5'RACE 使用引物 CatL-R1 (表 1)和通用引物 UPM，进行 5'端扩增。反应程序：94 ℃ 3 min；94 ℃ 30 s，72 ℃ 3 min，5 个循环；94 ℃ 30 s，70 ℃ 30 s，72 ℃ 3 min，5 个循环；94 ℃ 30 s，68 ℃ 30 s，72 ℃ 3 min，25 个循环；72 ℃ 10 min。

表 1 本研究所用引物序列

Table 1 Sequence of study primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'-3')
CatL-F1	CAGGCATCTGCTGTCCAT
CatL-R1	TGACGGCTCCCTTTGACC
CatL-F2	TGACTGGACTGACTAAGCTGGA
CatL-R2	TTGAGATAGTCGTAGGCCCATT
UPM	CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGC
18*S* rRNA-F	TATACGCTAGTGGAGCTGGAA
18*S* rRNA-R	GGGGAGGTAGTGACGAAAAAT

3'和 5'RACE 扩增产物经 1.5%琼脂糖凝胶电泳检测，用胶回收试剂盒回收目的片段，与 PMD18-T 载体连接，转化大肠杆菌 Top 10 感受态细胞，阳性克隆经菌落 PCR 鉴定后，送往上海生工公司进行测序。

1.4 序列分析

利用 DNAStar 软件中的 SeqMan 程序对测序结果进行载体序列去除和序列拼接，然后用 EditSeq 程序进行开放阅读框(ORF)的预测和氨基酸翻译。*EcCatL* 基因的核苷酸序列和推导氨基酸序列使用 BLAST(http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi)进行同源性比对。利用 Protparam 软件(http://www.expasy.org/tools/protparam.html)进行蛋白质理化性质预测。利用 Interpro Scan 软件

(http://www.ebi.ac.uk/Tool/InterProScan)进行蛋白质功能结构域分析。使用 Clustal X 软件对脊尾白虾与其他物种的 *CatL* 氨基酸序列进行多序列比对，在此基础上采用 MEGA 4.0 软件，以邻接法(neighbor-joining)构建系统进化树。

1.5　鳗弧菌和 WSSV 感染实验

实验用 WSSV 粗提液为黄海水产研究所病研室所赠，方法见 Li et al (2012b)。实验用鳗弧菌为黄海水产研究所杨爱国实验室所赠。实验用鳗弧菌于实验前一天进行菌种活化，经 2611E 液体培养基扩大培养后离心取沉淀，用无菌生理盐水稀释为 2×10^8 pfu/mL 的菌悬液，4 ℃保存备用。

实验前随机挑取 10 尾脊尾白虾，经白斑病毒综合征检测试剂盒检测证实无 WSSV 感染。随机选取暂养 7 d 的健康脊尾白虾分为对照组、鳗弧菌感染组和 WSSV 感染组，每组 50 尾。鳗弧菌感染组在每尾虾第二腹节部位注射鳗弧菌菌悬液 20 μL，WSSV 感染组在每尾虾第二腹节部位注射 WSSV 粗提液 20 μL，对照组注射等体积生理盐水。各组分别于注射后 0、3、6、12、24、48 及 72 h 取血细胞和肝胰腺，用于 RNA 提取，每个时间点取 6 尾。此外，为检测脊尾白虾 *EcCatL* 基因在不同组织中的表达水平，另取 6 尾健康脊尾白虾的血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢、肠、胃和眼柄组织，用于 RNA 提取。

1.6　*EcCatL* 基因表达分析

TRIzol 试剂提取不同实验组脊尾白虾血细胞和肝胰腺组织的总 RNA，反转录合成 cDNA，方法按 Han et al (2011)进行。

根据已获得的脊尾白虾内参基因 *18S rRNA* 和 *EcCatL* 基因全长序列，分别设计一对正反引物(18S rRNA-F/R 及 CatL-F2/R2)(表 1)，利用 Real-time PCR 对不同时间鳗弧菌和 WSSV 感染的脊尾白虾血细胞和肝胰腺中 *EcCatL* 基因的表达量进行检测。反应体系为 20 μL，包括 10 μL SYBR® Premix Ex *Taq*™ Ⅱ (×2)，0.8 μL 10 μmol/L 引物 CatL-F2，0.8 μL 10μmol/L 引物 CatL-R2，0.4 μL ROX Reference Dye Ⅱ (×50)*3，2.0 μL cDNA，6.0 μL DEPC 水。反应程序为：95 ℃ 30 s；95 ℃ 5 s，60 ℃ 34 s，40 个循环；95 ℃ 15 s，60 ℃ 1 min，95 ℃ 15 s。采用 $2^{-\triangle\triangle CT}$ 法计算 *EcCatL* 基因的表达量，用 SPSS 11.0 软件进行分析。

2　结　果

2.1　*EcCatL* 基因全长 cDNA 克隆

利用 Trizol 试剂提取获得脊尾白虾血细胞总 RNA，经紫外分光光度计检测，其 OD_{260}/OD_{280} 为 1.91，表明总 RNA 纯度较高；经 1.0%琼脂糖凝胶电泳检测(图 1)，18*S* 和 28*S* rRNA 条带清晰，完整性较好，符合实验要求。以特异性引物 CatL-F1 和 CatL-R1 分别与通用引物 UPM 配对，进行 3'RACE 和 5'RACE 扩增，获得～441 和～500 bp 的特异性条带各一 (图 1)。

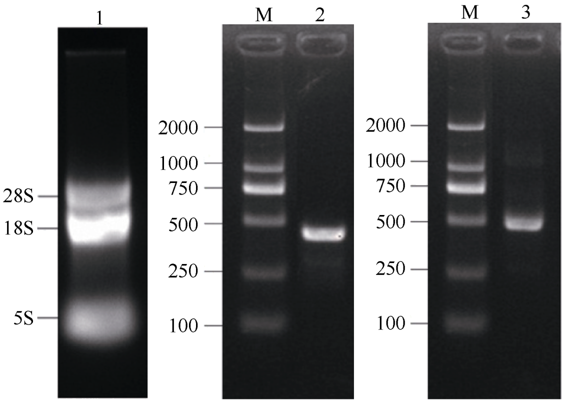

图 1　总 RNA 和 3'RACE、5'RACE 扩增产物的 1.0%琼脂糖凝胶电泳分析

Figure 1　Analysis of total RNA and amplification products of 3', 5'RACE by 1.0% agarose gel electrophoresis

M: DL 2000 Maker; 1: 总 RNA; 2: 3'RACE 产物; 3: 5'RACE 产物。

M: DL 2000 Marker; 1: total RNA; 2: 3'RACE product; 3: 5'RACE product.

2.2　*EcCatL* 基因全长 cDNA 序列特征分析

3'RACE 和 5'RACE 扩增产物分别测序后与 EST 序列进行拼接，获得脊尾白虾 *CatL* 基因的全长 cDNA 序列，命名为 *EcCatL*，GenBank 登录号为 JX508645。该基因全长 1136 bp，包括 24 bp 的 5'端非编码区(UTR)，152 bp 的 3'端非编码区和 960 bp 的开放阅读框。3'端含有多聚腺苷酸加尾信号 AATAAA 和 PolyA 尾 (图 2)。

氨基酸序列分析可知，*EcCatL* 基因编码一个由 319 个氨基酸残基组成的蛋白质，结构域分析表明，其 N 端含有 15 个氨基酸组成的信号肽，成熟肽位于第 15～319 位氨基酸之间，分子量为 35.30×10^3，理论等电点为 5.27。结构域分析表明，*EcCatL* 属于

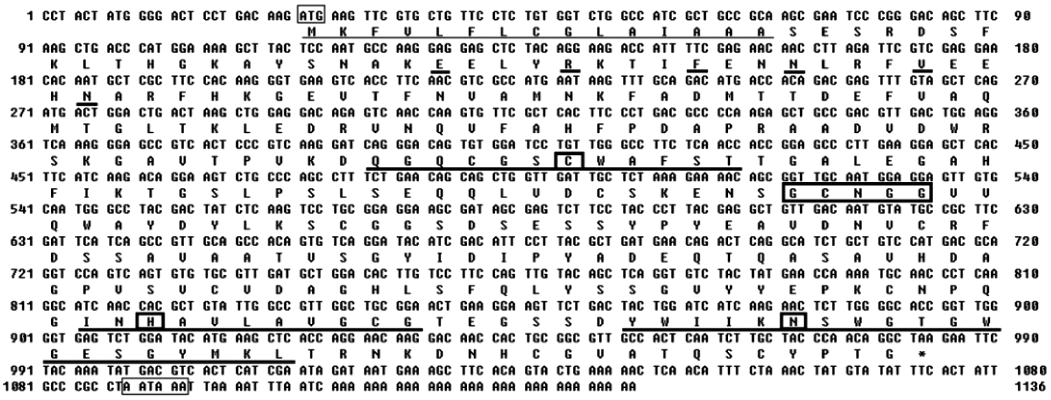

图 2 脊尾白虾 *EcCatL* 基因的核苷酸序列及其推导的氨基酸序列

Figure 2 Nucleotide sequence and deduced amino acid sequence of *E. carinicauda EcCatL* gene

细线方框内的 ATG 为起始密码子，AATAAA 为加尾信号；*：终止密码子；细下划线表示信号肽；粗线方框内为半胱氨酸蛋白酶活性位点，其对应的氨基酸序列以粗下划线表示；GCXGG 结构基序用粗线框表示，ERFNIN 基序用粗下划线表示。

Start codon (ATG) and plus tail signal (AATAAA) is marked with filament box; *: stop codon; Signal peptide sequence is marked with thin line (1-15); Cysteine proteases active sites are signed with thick boxes, and its amino sequences are labeled with thick lines; “GCXGG” is marked with thick boxes; “ERFNIN” is underlined with thick lines.

典型的组织蛋白酶中的半胱氨酸蛋白酶家族，第123～134 位氨基酸残基、第 264～274 位氨基酸残基及第 281～300 位氨基酸残基分别为半胱氨酸蛋白酶半胱氨酸、组氨酸及天冬氨酸活性位点。该蛋白存在组织蛋白酶 L 所特有的保守基序 ERFNIN [E-X3-R-X2-(I/V)-F-X3-N-X3-I-X3-N]和 GCXGG。

2.3 *EcCatL* 基因同源性分析

利用 BLAST 对脊尾白虾 *EcCatL* 基因进行同源性分析，发现脊尾白虾 *EcCatL* 基因与变色小长臂虾(*Palaemonetes varians*)和北极甜虾(*Pandalus borealis*)的同源性最高，分别为 92%和 76%。与其它虾蟹类如挪威海螯虾(*Nephrops norvegicus*)、美洲螯龙虾(*Homarus americanus*)、刀额新对虾(*Metapenaeus ensis*)、凡纳滨对虾、中华绒螯蟹及阿拉斯加帝王蟹(*Paralithodes camtschaticus*)等的同源性分别为 57%、56%、53%、53%、51%和 48%；与其它无脊椎动物动物如赤拟谷盗(*Tribolium castaneum*)、黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*)、埃及伊蚊(*Aedes aegypti*)、长牡蛎(*Crassostrea gigas*)和紫海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)的同源性分别为 53%、52%、50%、51%和 50%；与脊椎动物非洲象(*Loxodonta africana*)的同源性为 48%。利用 MEGA 4.0 软件进行系统进化分析表明，脊尾白虾组织蛋白酶 L *EcCatL* 与变色小长臂虾紧密聚为一支，之后聚类顺序依次为北极甜虾、挪威海螯虾及美洲螯龙虾等 (图 3)。

通过与北极甜虾、凡纳滨对虾、斑节对虾及中华绒螯蟹等甲壳动物的组织蛋白酶 L 的氨基酸序列进行比对发现，半胱氨酸蛋白酶半胱氨酸、组氨酸及天冬氨酸活性位点都高度保守，保守基序 ERFNIN、GNFD 和 GCXGG 在 8 种甲壳动物中都存在。

2.4 *EcCatL* 基因组织表达分析

利用 Real-time PCR 分析了脊尾白虾 *EcCatL* 基因在不同组织中的表达水平，结果表明：*EcCatL* 基因在血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢、肠、胃及眼柄中都有表达。其中，在肝胰腺中的表达量最高，其次为血细胞、鳃、胃、卵巢及肌肉，在肠和眼柄中的表达量最少(图 5)。

Real-time PCR 检测脊尾白虾在注射鳗弧菌和 WSSV 后不同时间血细胞中 *EcCatL* 基因的表达情况(图 6)。结果表明：鳗弧菌和 WSSV 刺激后，血细胞中 *EcCatL* 基因的表达量都极显著高于对照组($P<0.01$)。其中，鳗弧菌感染组和 WSSV 感染组血细胞中 *EcCatL* 基因表达量在注射早期(0～3 h)均出现下降，6～12 h 开始不断上升，于 12 h 达到最高值；在 24～48 h 表达量开始下降，并于 48 h 极显著低于对照组($P<0.01$)；72 h 后表达量逐渐上升至初始水平。血细胞中 *EcCatL* 基因的表达量总体表现为下降、升高、再下降、再升高至初始水平的趋势。

脊尾白虾在注射感染鳗弧菌和 WSSV 后，肝胰

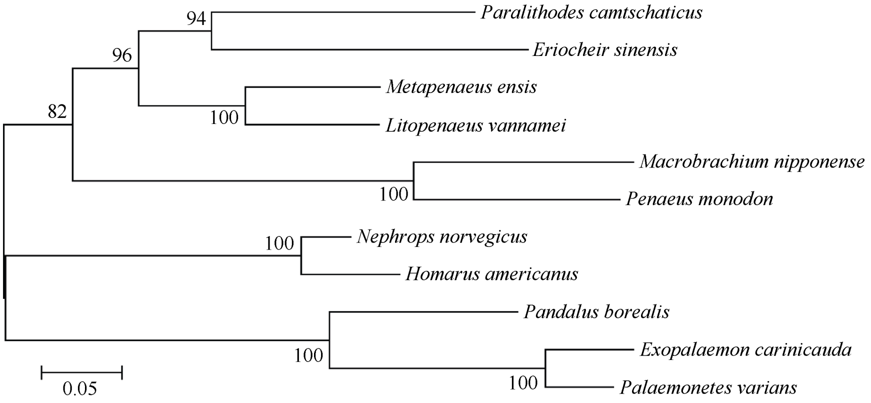

图 3　利用 MEGA 4.0 软件构建的基于 *CatL* 氨基酸序列的 NJ 系统进化树

Figure 3　NJ phylogenetic tree based on *CatL* amino acid sequences by MEGA 4.0

分叉处数值表示 1 000 次重复抽样所得到的置信度，只显示置信度>80%的数值；标尺长度表明每个位点发生 0.05 次置换。各物种 *CatL* 序列登录号为：变色小长臂虾 (ACR54126)、美洲螯龙虾 (CAA45129)、阿拉斯加帝王蟹 (ADQ73946)、中华绒螯蟹 (ADQ73946)、北极甜虾 (ACR54126)、刀额新对虾 (AAM96001)、日本沼虾 (AEC22811)、斑节对虾 (ABQ10739)、挪威海螯虾 (CAA56915)、凡纳滨对虾 (CAA68066)。

The values at the forks indicate the percentage of trees in which this grouping occurred after bootstrapping the data (1 000 replicates; shown only when >80%). GenBank accession numbers of *CatL* used are: *P. varians*, ACR54126; *H. americanus*, CAA45129; *P. camtschaticus*, ADQ73946; *E. sinensis*, ADQ73946; *P. borealis*, ACR54126; *M. ensis*, AAM96001; *Macrobrachium nipponense*, AEC22811; *Penaeus monodon*, ABQ10739; *N. norvegicus*, CAA56915; *L. vannamei*, CAA68066.

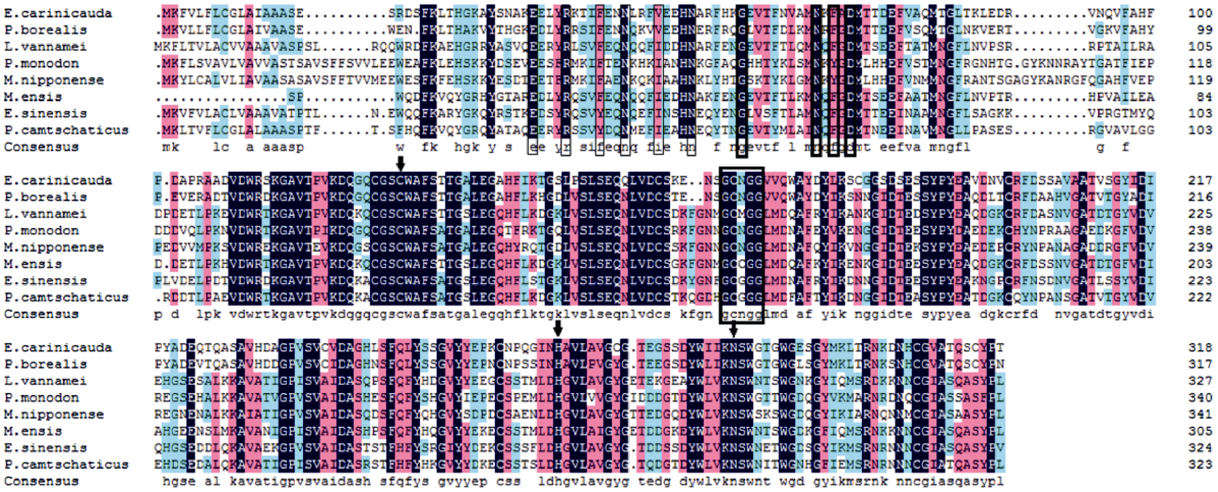

图 4　脊尾白虾 *EcCatL* 氨基酸序列与其他物种 *CatL* 氨基酸序列比对

Figure 4　Amino acid sequences alignment of *E. carinicauda EcCatL* with other species' *CatL*

半胱氨酸、组氨酸、天冬氨酸活性位点用箭头标出；ERFNIN 基序用细线方框标出；GCXGG 和 GNFD 基序分别用粗线方框标出。各物种 *CatL* 序列登录号为：北极甜虾 (ACR54126)、凡纳滨对虾 (CAA68066)、斑节对虾 (ABQ10739)、日本沼虾 (AEC22811)、刀额新对虾 (AAM96001)、中华绒螯蟹 (ADQ73946)、阿拉斯加帝王蟹 (ADQ73946)。

Cysteine, Histidine and Aspartate active sites are marked with arrows; "ERFNIN" is signed with thin box; "GCXG G" and "GNFD" are underlined with thick boxes. GenBank accession numbers of *CatL* used are: *P. borealis*, ACR54126; *L. vannamei*, CAA68066; *P. monodon*, ABQ10739; *M. nipponense*, AEC22811; *M. ensis*, AAM96001; *E. sinensis*, ADQ73946; *P. camtschaticus*, ADQ73946.

腺中 *EcCatL* 基因的表达情况见图 7。结果表明：与对照组相比，鳗弧菌和 WSSV 刺激后，肝胰腺中 *EcCatL* 的表达量都极显著高于对照组(P<0.01)。其中，鳗弧菌感染组和 WSSV 感染组血细胞中 *EcCatL* 基因的表达量在注射早期(0～3 h)均出现下降，6～12 h 开始不断上升，于 12 h 达到最高值，随后逐渐下降；在 24～48 h 表达量开始上升，并于 48 h 表达量极显著的高于对照组(P<0.01)；72 h 后血细胞中 *EcCatL* 基因的表达量逐渐回落至初始水平。肝胰腺中 *EcCatL* 基因的表达量总体表现为下降、升高、再下降、再升高、最后下降至初始水平的趋势。

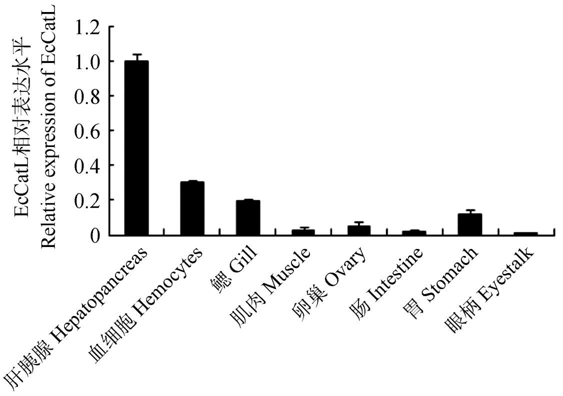

图 5 脊尾白虾组织蛋白酶 L *EcCatL* 基因在不同组织中的表达分布

Figure 5 Distribution of *EcCatL* gene expression in different tissues of *E. carinicauda*

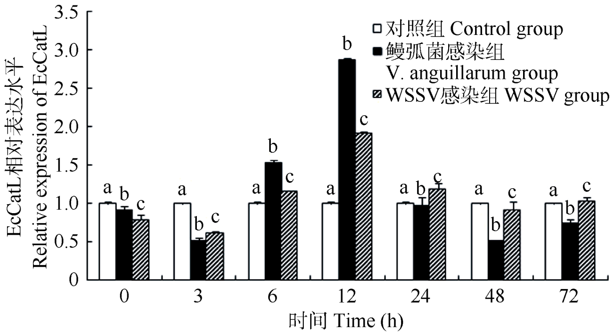

图 6 注射鳗弧菌和 WSSV 后脊尾白虾血细胞中 *EcCatL* 基因的表达情况

Figure 6 Expression of *EcCatL* gene in *E. carinicauda* hemocytes after *V. anguillarum* and WSSV injection

同一时间，不同字母表示组间差异极显著(P<0.01)，相同字母表示组间差异不显著(P>0.05)。

Different letters indicate extremely significant differences (P<0.01), same letters indicate no significant differences (P>0.05) in the same observed period.

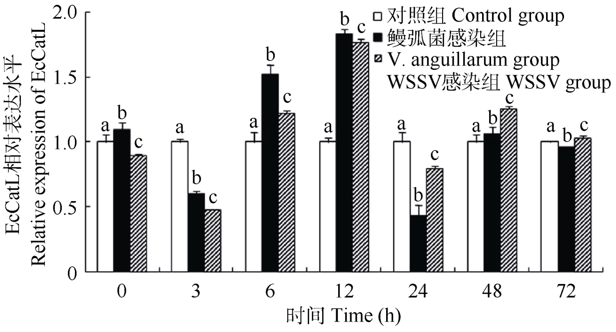

图 7 注射鳗弧菌和 WSSV 后脊尾白虾肝胰腺中 *EcCatL* 基因的表达情况

Figure 7 Expression of *EcCatL* gene in *E. carinicauda* hepatopancreas after *V. anguillarum* and WSSV injection

同一时间，不同字母表示组间差异极显著(P<0.01)，相同字母表示组间差异不显著(P>0.05)。

Different letters indicate extremely significant differences (P<0.01), same letters indicate no significant differences (P>0.05) in the same observed period.

3 讨 论

本研究首次克隆得到脊尾白虾组织蛋白酶 L *EcCatL* 基因序列，全长 1136 bp，包含 960 bp 的开放阅读框，编码一个 319 个氨基酸组成的多肽。序列分析发现，与其他甲壳动物的组织蛋白酶 L 一样，*EcCatL* 基因编码的氨基酸序列含有半胱氨酸、组氨酸和天冬氨酸 3 个半胱氨酸蛋白酶活性位点以及半胱氨酸蛋白酶中高度保守的 GNFD 基序、重要结构基序 GCXGG 基序和组织蛋白酶 L 家族高度保守的 ERFNIN [E-X3-R-X2-(I/V)-F-X3-N-X3-I-X3-N] 基序。与其它动物氨基酸序列的比对发现该序列与已知甲壳动物的同源性较高，均>80%。系统进化分析表明脊尾白虾与变色小长臂虾首先聚为一支，且与北极甜虾、斑节对虾和中华绒螯蟹等虾蟹类的同源性>50%。以上结果表明该序列为脊尾白虾组蛋白酶 L *EcCatL* 基因。

研究报道表明，斑马鱼(*Danio rerio*)中发现 3 种类型的组织蛋白酶 L，合浦珠母贝(*Pinctada fucata*)中存在 2 种类型的组织蛋白酶 L(Bai et al，2011)。本研究只发现脊尾白虾组织蛋白酶 L 的一种基因，是否存在其他类型，有待进一步研究。ERFNIN 基序是组织蛋白酶 L 家族的高度保守基序(Bai et al，2011)，其中 4 个氨基酸是最保守的，而苯丙氨酸 F 和异亮氨酸 I 在不同物种中有所变化，本研究脊尾白虾组织蛋白酶 L 的 ERFNIN 基序的异亮氨酸 I 被缬氨酸 V 所取代，该特征与北极甜虾一致 (图 4)；而中华绒螯蟹和阿拉斯加帝王蟹的苯丙氨酸 F 被酪氨酸 Y 所取代。GCXGG 基序也是半胱氨酸蛋白酶非常重要的结构基序(Bai et al，2011；Karrer et al，1993)，除中间的 X 代表不同的氨基酸外，其它 4 种氨基酸均保守，脊尾白虾组织蛋白酶 L 的 GCXGG 基序中 X 为天冬氨酸 N，而南美白对虾为甲硫氨酸 M，中华绒螯蟹和阿拉斯加帝王蟹为甘氨酸 G，刀额新对虾为半胱氨酸 C。本研究脊尾白虾组织蛋白酶 L 重要基序的序列保守性和与其他物种相同的酶活性位点，表明脊尾白虾组织蛋白酶 L 与其他物种组织蛋白酶 L 具有相似的蛋白功能。

脊尾白虾 *EcCatL* 基因的表达具有组织特异性，Real time-PCR 结果显示，脊尾白虾 *EcCatL* 基因在血细胞、鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢、肠、胃及眼柄中均有表达(图 5)。其中，在肝胰腺中的表达量最高，与中华绒螯蟹 *CatL* 基因组织表达情况一致(Li et al，2010)，在肠和眼柄中的表达量最少，说明脊尾白虾

肝胰腺是参与组织蛋白酶 L 储存和释放的主要器官。

免疫系统主要包括固有免疫和获得性免疫两大类(Salminen et al，2008)。无脊椎动物缺乏抗体介导的获得性免疫，其机体免疫防御的发挥主要依靠其固有免疫系统，如血细胞的吞噬、包囊以及血淋巴中的一些酶和免疫因子的杀菌、抗菌作用，以此来识别和有效清除入侵的微生物和寄生虫等异物，保持体内外平衡(Roch，1999)。组织蛋白酶 L 作为一种溶酶体蛋白，近年来在无脊椎动物的先天免疫调控方面的研究取得了较大的进展。De Gregorio 对黑腹果蝇的研究表明，组织蛋白酶 L 表达量在细菌刺激后显著上调，认为组织蛋白酶 L 是一种参与机体免疫反应的重要基因(Tisca & Mosca，2004)。在被 WSSV 感染后，组织蛋白酶 L 在凡纳滨对虾肝胰腺中的表达量显著上调，表明其参与了病毒防御过程(Zhao et al，2007)；在被鳗弧菌感染后，中华绒螯蟹 *CatL* 在血细胞中的表达量发生显著性变化(Li et al，2010)；在被溶藻弧菌(*Vibrio alginolyticus*)感染后，合浦珠母贝 *CatL1* 和 *CatL2* 的表达量出现急剧变化(Ma et al，2010a, b)。因此，组织蛋白酶 L 可能在细菌和病毒的防御过程中起着重要作用。

为了研究组织蛋白酶 L 在脊尾白虾非特异性免疫防御中的作用，本研究设计了细菌(鳗弧菌)和病毒(WSSV)感染实验，发现感染后的脊尾白虾血细胞和肝胰腺 *EcCatL* 表达量均有明显的时间差异性，变化趋势基本一致。注射鳗弧菌和 WSSV 后血细胞和肝胰腺中 *EcCatL* 的表达量均在 12 h 时达到最大值，与对照组相差异性极显著(P<0.01)，表明 *EcCatL* 可能参与了免疫反应的应答。刺激后 12～24 h *EcCatL* 表达量下降，可能意味着机体处于感染后的恢复期(Sun et al，2010)。类似的基因表达情况也见于鳗弧菌刺激后的中华绒螯蟹(Li et al，2010)。注射鳗弧菌和 WSSV 后，脊尾白虾血细胞 *EcCatL* 表达水平明显高于肝胰腺，可能由组织器官功能差异性所致(Li et al，2012b)。血细胞是虾类非特异免疫防御的首要组织，在病原体入侵后担当机体非特异免疫防御的重任，能够比其他组织更迅速地上调 *EcCatL* 基因表达。

本研究成功克隆了脊尾白虾 *EcCatL* 基因全长 cDNA 序列，通过分析鳗弧菌和 WSSV 感染后脊尾白虾血细胞和肝胰腺中 *EcCatL* 基因表达特征，可以进一步认定 *EcCatL* 基因参与了脊尾白虾的免疫应答反应，在清除病原体的防御反应中起着重要作用，为深入研究脊尾白虾 *EcCatL* 基因在病原体刺激下发挥免疫功能的途径和机理奠定了基础。

参考文献：

Bai ZY, Wang GL, Li JL. 2011. Cloning and characterization of cathepsin L gene and evolution analysis in *Hyriopsis cumingii*. *Biotechnol Bull,* (6): 104-111. [白志毅, 汪桂玲, 李家乐. 2011. 三角帆蚌组织蛋白酶 L 基因的克隆和序列特征与进化分析. 生物技术通报, (6): 104-111.]

Bu XJ, Zhang XW, Sun YD, Zhao XF, Wang JX. 2008. Recombinant expression and tissue distribution of cathepsin L from Chinese shrimp *Fenneropenaeus chinensis*. *J Fish Sci Chn,* 15(6): 910-916. [卜兴江, 仉晓文, 孙允东, 赵小凡, 王金星. 2008. 中国明对虾组织蛋白酶 L 的原核重组表达及其组织分布. 中国水产科学, 15(6): 910-916.]

Dohchin A, Suzuki JI, Seki H, Masutani M, Shiroto H, Kawakami Y. 2000. Immunostained cathepsins B and L correlate with depth of invasion and different metastatic pathways in early stage gastric carcinoma. *Cancer,* 89(3): 482-487.

Furuyama N, Fujisawa Y. 2000. Distinct roles of cathepsin K and cathepsin L in osteoclastic bone resorption. *Endocr Res,* 26(2): 189-204.

Han JY, Li J, Li JT, Chang ZQ, Chen P, Li H. 2011. Cloning and expression of heat shock protein 70 (HSP70) of *Exopalaemon carinicauda*. *J Fisher Chn,* 35(8): 1130-1138. [韩俊英, 李健, 李吉涛, 常志强, 陈萍, 李华. 2011. 脊尾白虾热休克蛋白 HSP70 基因的克隆及其表达分析. 水产学报, 35(8): 1130-1138.]

Karrer KM, Peiffer SL, Ditomas ME. 1993. Two distinct gene subfamilies within the family of cysteine protease genes. *Proc Natl Acad Sci USA,* 90(7): 3063-3067.

Kos J, Werle B, Lah T, Brunner N. 2000. Cysteine proteinases and their inhibitors in extracellular fluids: markers for diagnosis and prognosis in cancer. *Internat J Biolog Markers,* 15(1): 84-89.

Li JT, Han JY, Chen P, Chang ZQ, He YY, Liu P, Wang QY, Li J. 2012a. Cloning of a heat shock protein 90 (HSP90) gene and expression analysis in the ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Fish Shellfish Immunol,* 32(6): 1191-1197.

Li MY, Li J, Liu P, Li JT. 2012b. Cloning and expression analysis of ferritin gene in *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanol Et Limnol Sin,* 43(2): 306-312. [李美玉, 李健, 刘萍, 李吉涛. 2012. 脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*) ferritin 基因克隆及表达分析. 海洋与湖沼, 43(2): 306-312.]

Li WW, Jin XK, He L, Jiang H, Gong YN, Xie YN, Wang Q. 2010. Molecular cloning, characterization, expression and activity analysis of cathepsin L in Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*. *Fish Shellfish Immunol,* 29(6): 1010-1018.

Lindeman JH, Hanemaaijer R, Mulder A, Dijkstra PDS, Szuhai K, Bromme D, Verheijen JH, Hogendoorn PCW. 2004. Cathepsin K is the principal protease in giant cell tumor of bone. *Amer J Pathol,* 165(2): 593-600.

Liu LQ, Warner AH. 2006. Further characterization of the cathepsin L-associated protein and its gene in two species of the brine shrimp, *Artemia*. *Comp Biochem Physiol A,* 145(4): 458-467.

Liu RY. 1955. The Economic Shrimps in Northern of China. Beijing: Science Press. [刘瑞玉. 1955. 中国北部的经济虾类. 北京: 科学出版社.]

Ma JJ, Zhang DC, Cui SG, Jiang JJ, Pu HL, Jiang SG. 2010a. Molecular characterization and expression analysis of cathepsin L2 cysteine protease from pearl oyster *Pinctada fucata*. *J Fish Sci Chn,* 17(4): 701-712. [麻建军, 张殿昌, 崔淑歌, 姜晶晶, 蒲含林, 江世贵. 2010. 合浦珠母贝组织蛋白酶 L2 基因的特征与组织表达分析. 中国水产科学, 17(4): 701-712.]

Ma JJ, Zhang DC, Jiang JJ, Cui SG, Pu HL, Jiang SG. 2010b. Molecular characterization and expression analysis of cathepsin L1 cysteine protease from pearl oyster *Pinctada fucata*. *Fish Shellfish Immunol,* 29(3): 501-507.

Roch P. 1999. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates. *Aquaculture,* 172(1-2): 125-145.

Salminen A, Huuskonen J, Ojala J, Kauppinen A, Kaarniranta K, Suuronen T. 2008. Activation of innate immunity system during aging: NF-kB signaling is the molecular culprit of inflamm-aging. *Ageing Res Rev,* 7(2): 83-105.

Sun J, Wang BJ, Li XH, Sun SJ, Liu M, Jiang KY, Wang L. 2010. The full length cDNA cloning and expression profile of prophenoloxidase of *Fenneropenaeus chinensis*. *J Fisher Chn,* 34(1): 56-66. [孙杰, 王宝杰, 李晓华, 孙淑娟, 刘梅, 蒋克勇, 王雷. 2010. 中国明对虾酚氧化酶原基因cDNA 的克隆与表达特征. 水产学报, 34(1): 56-66.]

Tisca PG, Mosca F. 2004. Defense mechanisms in farmed marine molluscs. *Vet Res Commun,* 28(1): 57-62.

Venier P, De Pittà C, Pallavicini A, Marsano F, Varotto L, Romualdi C, Dondero F, Viarengo A, Lanfranchi G. 2006. Development of mussel mRNA profiling: can gene expression trends reveal coastal water pollution. *Mutat Res,* 602(1-2): 121-134.

Xu WJ, Xie JJ, Shi H, Li CW. 2010. *Hematodinium* infections in cultured ridgetail white prawns, *Exopalaemon carinicauda*, in eastern China. *Aquaculture,* 300(1-4): 25-31.

Xu WJ, Xie JJ, Shi H, Zhang J, Zhang JS. 2010. Infection of *Hematodinium sp*. in farmed ridgetail white prawn *Exopalaemon carinicauda*. *Oceanol Et Limnol Sin,* 41(3): 396-402. [许文军, 谢建军, 施慧, 张静, 张家松. 2010. 池塘养殖脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)感染血卵涡鞭虫的研究. 海洋与湖沼, 41(3): 396-402.]

Zeng GZ, Tan NH, Jia RR, Pan XL. 2005. Cathepsins: Structures, Functions and Inhibitors. *Acta Bot Yunnanica,* 27(4): 337-354. [曾广智, 谭宁华, 贾锐锐, 潘蓄林. 2005. 组织蛋白酶及其抑制剂研究进展. 云南植物研究, 27(4): 337-354.]

Zhao ZY, Yin ZX, Wang SP, Guan HJ, Li SD, Xing K, Chan SM, He JG. 2007. Profiling of differentially expressed genes in hepatopancreas of white spot syndrome virus-resistant shrimp (*Litopenaeus vannamei*) by suppression subtractive hybridisation. *Fish Shellfish Immunol,* 22(5): 520-534.